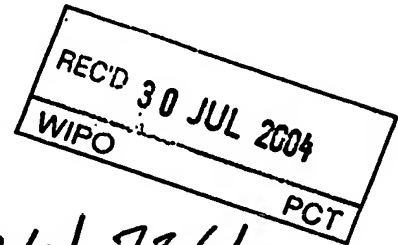


10111200 4 / 0 0 / 5 0

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



E604/7364

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

103 32 685.5

Anmeldetag:

18. Juli 2003

Anmelder/Inhaber:

Bayer HealthCare AG,
51373 Leverkusen/DE

Erstanmelder: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT,
51368 Leverkusen/DE

Bezeichnung:

Vorhof-selektiv exprimierte Kaliumkanäle

IPC:

A 61 K, A 61 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 29. April 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Agurks

Vorhof-selektiv exprimierte Kaliumkanäle

5 Die Erfindung betrifft die Verwendung von Kaliumkanal-Modulatoren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Herzrhythmusstörungen, koronaren Herzkrankheiten sowie Bluthochdruck oder einer Kombination der genannten Erkrankungen.

10 Die Zellen des Sinusknotens im rechten Vorhof des Herzens haben die Funktion eines physiologischen Schrittmachers, da dort in regelmäßigen Intervallen eine elektrische Erregung ihren Ursprung hat. Verantwortlich für die Erregungsleitung ist eine Membranpotentialänderung, die durch die Konzentration verschiedener Ionen auf beiden Seiten einer Zellmembran bestimmt wird (Na^+ , K^+ und Ca^{2+}). Diese Ionen passieren die Zellmembran durch ionenselektive Kanäle, die aus mehreren
15 Untereinheiten bestehen und zusammen eine Pore bilden. Während einer Herzaktion (Systole) durchläuft die Herzmuskelzelle ein Aktionspotential, das sich aus den Phasen 0-3 zusammensetzt und an dem alle drei o. g. Typen von Ionenkanälen beteiligt sind. Die Aktion beginnt mit einer raschen Depolarisation (Phase 0), an der vor allem Na^+ -Kanäle beteiligt sind, gefolgt von einer transienten, unvollständigen
20 Repolarisation (Phase 1) die in die lang anhaltende Plateauphase (Phase 2) übergeht und an der vor allem Ca^{2+} -Kanäle beteiligt sind. Die Phase 3 repräsentiert die Repolarisation und ist damit für die Wiederherstellung des Ruhezustandes verantwortlich. Der zur Repolarisation notwendige K^+ -Ausstrom wird durch Kaliumkanäle vermittelt. Während des gesamten Aktionspotentials ist die Membran vor einem
25 weiteren depolarisierenden Reiz geschützt, sie ist refraktär (1).

Bei Arrhythmien kommt es entweder zu Störungen der Erregungsbildung, der Erregungsleitung oder einer Kombination aus beiden. Ursache hierfür können Ischämien, entzündliche Erkrankungen des Herzmuskels aber auch Intoxikationen
30 oder vegetative Einflüsse sein. Substanzen und Verfahren, die die Erregungsbildung oder Weiterleitung beeinflussen, werden therapeutisch zur Behandlung von

Arrhythmien eingesetzt. Substanzen, die den repolarisierenden K^+ -Strom verzögern und dadurch Aktionspotentialdauer und Refraktärzeit verlängern, gehören zu den sog. Klasse-III-Antiarrhythmika von denen zur Zeit in Deutschland Amiodaron und Sotalol zugelassen sind (1).

5

Beide Substanzen sind allerdings keine selektiven Kaliumkanalblocker: So zeigt Sotalol neben einer Blockade verschiedener K^+ -Kanäle (z. B. HERG) auch antagonistische Eigenschaften für beta-adrenerge Rezeptoren während Amiodaron neben HERG auch den L-Typ Ca^{2+} -Kanal und Na^+ -Kanäle blockiert (1), (2).

10

Ebenso wie die anderen Klassen von Antiarrhythmika besitzen auch die Klasse-III Kaliumkanalblocker ein beträchtliches pro-arrhythmisches Potential, welches auf die gleichzeitige Beeinflussung der Kaliumkanäle im Ventrikel zurückgeführt wird und den klinischen Einsatz limitiert. Insofern kommt der Identifizierung von bevorzugt im Vorhof exprimierten Kaliumkanälen als möglichen Antiarrhythmika-targets ein besondere Bedeutung zu, da hierdurch die Nebenwirkungen, die bis zu tödlichem Kammerflimmern reichen, gesenkt werden könnten (3).

15

Neben Kaliumkanalblockern wie Sotalol und Amiodaron sind auch antiarrhythmische Wirkungen von Kaliumkanalöffnern z. B. für den ATP-abhängigen Kaliumkanal beschrieben (4).

20

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels Affymetrix-MicroArray-Technologie Gene identifiziert, die im humanen Herz differentiell zwischen linkem Vorhof und linkem Ventrikel exprimiert werden. (s. Fig. 1). Die Verifizierung der differentiellen Expression ausgewählter Gene erfolgte mittels Real-time PCR (TaqMan). Dabei zeigte sich, dass bei allen 6 untersuchten Patienten die Kaliumkanäle TWIK-1 (5), TASK-1 (6), GIRK1 (7), SK2 (8) und PCN1 (9) deutlich stärker im Vorhof als im Ventrikel exprimiert werden (s. Fig. 3).

25

30

Die vorliegende Erfindung betrifft daher die Verwendung von Modulatoren der zuvor genannten Kaliumkanäle zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder der Prophylaxe der oben genannten Krankheiten.

5 Kaliumkanalmodulatoren im Sinne der vorliegenden Offenbarung sind Substanzen welche die Öffnungsdauer der genannten Kaliumkanäle verlängern oder verkürzen.

10 Modulatoren im Sinne der Erfindung sind alle Substanzen, die eine Veränderung der biologischen Aktivität der Kanäle bewirken. Besonders bevorzugte Modulatoren sind Nukleinsäuren inklusive „locked nucleic acids“, „peptide nucleic acids“ und „Spiegelmere“, Proteine inklusive Antikörper und niedermolekulare Substanzen, ganz besonders bevorzugte Modulatoren sind niedermolekulare Substanzen.

15 Die Erfindung betrifft die Verwendung von Modulatoren der Kaliumkanäle TWIK-1, TASK-1, GIRK1, SK2 oder PCN1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien), koronaren Herzkrankheiten oder Bluthochdruck.

20 Desweiteren betrifft die Erfindung die Verwendung von Modulatoren der Kaliumkanäle TWIK-1, TASK-1, GIRK1, SK2 oder PCN1 mit einem IC_{50} von $< 1 \mu M$, besonders bevorzugt von $< 100 \text{ nM}$ zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien), koronaren Herzkrankheiten oder Bluthochdruck.

25 Ein weiterer Erfindungsgegenstand ist eine Methode zum Screenen von Testverbindungen zur Identifizierung von Modulatoren der Kaliumkanäle TWIK-1, TASK-1, GIRK1, SK2 oder PCN1, welche geeignet sind für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien), koronaren Herzkrankheiten oder Bluthochdruck.

5 Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend einen Modulator oder mehrere Modulatoren der Kaliumkanäle TWIK-1, TASK-1, GIRK1, SK2 oder PCN1 zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien), koronaren Herzkrankheiten oder Bluthochdruck.

10 Erfindungsgegenstand ist des weiteren die Verwendung von Modulatoren der Kaliumkanäle TWIK-1, TASK-1, GIRK1, SK2 oder PCN1 für die Regulation der Aktivität der entsprechenden Kaliumkanäle in einem Lebewesen einschließlich des Menschen zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien), koronaren Herzkrankheiten oder Bluthochdruck.

15 Die Erfindung betrifft auch Modulatoren der Kaliumkanäle TWIK-1, TASK-1, GIRK1, SK2 oder PCN1 zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien), koronaren Herzkrankheiten oder Bluthochdruck.

20 Erfindungsgemäß ist ebenfalls die Verwendung von Modulatoren von Genprodukten, welche im humanen Herz differentiell zwischen linkem Vorhof und linkem Ventrikel exprimiert werden, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Arrhythmien, koronaren Herzkrankheiten, Bluthochdruck und den Folgen der Atherosklerose. Da in Abhängigkeit von der Funktion des Genproduktes durchaus auch eine verstärkte Expression im Ventrikel bevorzugt sein kann (z. B. für den Endothelin A-Rezeptor), wird hier der Begriff differentielle Genexpression verwendet.

25 Ein weiterer Erfindungsgegenstand ist eine Methode zum Screenen von Testverbindungen zur Identifizierung von Modulatoren von Genprodukten, welche im humanen Herz differentiell zwischen linkem Vorhof und linkem Ventrikel exprimiert werden, die geeignet sind für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien), koronaren Herzkrankheiten oder Bluthochdruck.

30

5 Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend einen Modulator oder mehrere Modulatoren von Genprodukten, welche im humanen Herz differentiell zwischen linkem Vorhof und linkem Ventrikel exprimiert werden, zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien), koronaren Herzkrankheiten oder Bluthochdruck.

10 Erfindungsgegenstand ist des weiteren die Verwendung von Modulatoren von Genprodukten, welche im humanen Herz differentiell zwischen linkem Vorhof und linkem Ventrikel exprimiert werden, für die Regulation der Aktivität der entsprechenden Genprodukte in einem Lebewesen einschließlich des Menschen zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien), koronaren Herzkrankheiten oder Bluthochdruck.

15 Die Erfindung betrifft auch Modulatoren von Genprodukten, welche im humanen Herz differentiell zwischen linkem Vorhof und linkem Ventrikel exprimiert werden, zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien), koronaren Herzkrankheiten oder Bluthochdruck.

20 Substanzen, die eine modulierende Wirkung auf die Aktivität der genannten Kanäle haben, können mit dem unten beschriebenen Assay identifiziert werden (Screening).

Die Testung der anti-arrhythmischen Wirkung *in vivo* erfolgt mit dem unten beschriebenen Tierversuch.

25

Beschreibung der Figuren

Figur 1: Tabellarisch aufgelistet sind Gene, die bei allen 6 untersuchten Patienten übereinstimmend differentiell exprimiert zwischen Vorhof und Ventrikel gefunden wurden.

Figur 2: Tabellarisch aufgelistet sind die Genbank Accession-Nummern der mittels TaqMan-PCR verifizierten Gene sowie die dafür verwendeten Primer/Sonden-Sequenzen.

Figur 3: Dargestellt ist die relative mRNA-Expression der Kaliumkanäle TWIK-1, TASK-1, GIRK1 SK2 und PCN1 in humanen Herzen (linker Vorhof [schwarz] und linker Ventrikel [weiss]).

Beispiele

Beispiel 1: Identifizierung differentiell exprimierter Gene zwischen humanem Ventrikel und Vorhof

5

Kleine Stücke (ca. 0,5 g) vom linken Ventrikel bzw. vom linken Vorhof explantierter Herzen wurden mit Einverständnis der Spender vom Herzzentrum Halle (Prof. Morawietz) erhalten. Die Gesamt-RNA hieraus wurde nach Homogenisierung der Gewebe mittels RNeasy-Säulen (Fa. Qiagen) gemäß der Anleitung isoliert. Die Umschreibung von jeweils 10 µg Gesamt-RNA in cDNA, deren anschließende lineare Amplifikation sowie die Hybridisierung der biotinylierten cRNA auf humanen HG-U133A Arrays erfolgte gemäß dem „Affymetrix User Guide“ unter Verwendung von Superscript-II (Fa. Gibco) und des „High Yield cRNA labeling Kits (Fa. Enzo). Der HG-U133A Array erlaubt prinzipiell die simultane mRNA-Analyse von ca. 22.600 humanen Genen. Die Auswertung der Arrays erfolgte mit der Software MAS 5.0 (Fa. Affymetrix) und Gene Spring 5.0 (Fa. Silicon Genetics). In Fig. 1 sind die Gene zusammengefasst, die in allen 6 untersuchten Patienten zwischen Vorhof und Ventrikel differentiell exprimiert wurden. Angegeben ist der Quotient der normierten Expression aus Vorhof und Ventrikel, und zwar jeweils als Mittelwert aus allen 6 Probanden.

10

15

20

Die mittels Array zwischen Vorhof und Ventrikel gefundene differentielle Expression der Kaliumkanäle TWIK-1, TASK-1, GIRK1, SK2 und PCN1 wird durch die Quantifizierung der mRNA in einer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion verifiziert (10). Hierzu wird die Gesamt-RNA wie oben beschrieben aus den humanen Myokardproben isoliert und je 1 µg davon zur Entfernung von Kontaminationen genomischer DNA mit 1 Einheit DNase I (Fa. Gibco) für 15 min bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Inaktivierung der DNase I erfolgt durch Zugabe von 1 µl EDTA (25 mM) und nachfolgendes Erhitzen auf 65°C (10 min). Anschließend wird im selben Reaktionsansatz die cDNA-Synthese gemäß der Anleitung zum „SUPERScript-II

25

30

RT cDNA synthesis kit“ (Fa. Gibco) durchgeführt und das Reaktionsvolumen mit destilliertem Wasser auf 200 µl aufgefüllt.

Für die PCR wird zu je 5 µl der verdünnten cDNA-Lösung 7,5 µl Gemisch von Primer und Sonde sowie 12,5 µl TaqMan-Reaktionslösung [Universal Master Mix (Fa. Applied Biosystems)] gegeben. Die Endkonzentration der Primer ist jeweils 300 nM, die der Sonde 150 nM. Die Sequenzen der Primer sowie die Genbank Accession-Nummern der analysierten Gene sind in Fig. 2 angegeben. Die Identifizierung geeigneter Primer- und Sondensequenzen erfolgte mit dem Programm Primer Express 5.0 (Fa. Applied Biosystems), die PCR erfolgt auf einem ABI-Prism-SDS-7700-Gerät (Fa. Applied Biosystems) gemäß der Anleitung des Herstellers. Aufgezeichnet wird bei der Real-time PCR der sog. Ct-Wert, der für das betreffende Gen im untersuchten Gewebe erhalten wird. Dieser entspricht dem Zyklus, in dem die Fluoreszenzintensität der freigesetzten Sonde ca. 10 Standardabweichungen über dem Hintergrundsignal liegt. Je niedriger der Ct-Wert, umso früher beginnt also die Vervielfältigung, d. h. je mehr mRNA ist in der ursprünglichen Probe enthalten. Zum Ausgleich eventueller Schwankungen bei der cDNA-Synthese wird in allen untersuchten Geweben auch die Expression eines sog. „Haushaltsgenes“ analysiert. Dieses sollte in allen Geweben ungefähr gleich stark exprimiert werden. Für die Normierung der Kaliumkanalexpressionen wurde für Vorhof und Ventrikel einheitlich β-Actin verwendet. Für die graphische Darstellung der relativen mRNA-Expression wird für jedes Gen und jedes Gewebe der dCt-Wert berechnet. Der dCt-Wert ist die Differenz zwischen dem Ct-Wert des untersuchten Kaliumkanals und dem Ct-Wert des Haushaltsgens im jeweiligen Gewebe. Aus diesem Wert wird nach folgender Formel die relative Expression rE berechnet: $rE = 2^{(20-dCt)}$ Diese ist in Fig. 3 als dimensionslose Zahl angegeben.

Beispiel 2: Identifizierung von Kaliumkanalmodulatoren

Die Identifizierung von Kaliumkanalmodulatoren erfolgt in einem zellulären Assay bei dem CHO-Zellen den jeweiligen Ionenkanal rekombinant exprimieren und unter

Verwendung des potential-sensitiven Farbstoffs Dye B aus dem „FLIPR membrane potential assay kit“ (Fa. Molecular Probes). Eine Depolarisation der Zellen durch eine chemische Substanz führt zu einer vermehrten Aufnahme des Farbstoffs „Dye B“ und dadurch zu einer erhöhten intrazellulären Fluoreszenzintensität. Eine Hyperpolarisation der Zelle durch eine chemische Substanz führt dagegen zu einer Abnahme der Farbstoffkonzentration in der Zelle und damit auch zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität, da die Quantenausbeute von Dye B in wässriger Lösung geringer ist. Zur Messung werden konfluente Zellen verwendet, die nach Entfernen des Mediums entsprechend den Vorschriften des Kit-Herstellers (Molecular Probes) bei Raumtemperatur mit dem Farbstoff Dye B beladen werden. Die Fluoreszenzmessung erfolgt ebenfalls bei Raumtemperatur in einer Fluobox (Fa. Tecan) bei einer Anregungswellenlänge von 520 nm und einer Absorptionswellenlänge von 575 nm, wie zum Beispiel beschrieben in (11).

Beispiel 3: Testung der *in vivo* Wirkung von Kaliumkanalmodulatoren

Der Einfluss der Kaliumkanalmodulatoren auf die Herzfrequenz wird an narkotisierten Ratten untersucht. Hierzu werden männliche Wistarratten (250-300g) mit 10mg/kg Thiobutabarbital i. p. (Inactin, Byk Gulden) narkotisiert und anschließend getötet. Nach Thoraxeröffnung wird das Herz freigelegt, der rechte Vorhof isoliert und unter einer 1g-Vorspannung in einer 30°C warmen Krebs-Henseleit-Lösung (in einem 10 ml Organbad) aufbewahrt. Diese Lösung wird mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) bei pH 7.2-7.4 begast. Die Vorhöfe schlagen spontan und nach Aufzeichnung einer Kontrollperiode (Parameter: Frequenz) werden die Testsubstanzen in einer Dosisreihe appliziert. Pro Dosis wird die Veränderung der Frequenz im Vergleich zu Placebo-behandelten Kontrollen ausgewertet.

Beispiel 4: Kaliumkanalmodulator-Formulierungen

Die Kaliumkanalmodulatoren können in bekannter Weise in die üblichen Formulierungen überführt werden, wie Tabletten, Dragees, Pillen, Granulate, Aerosole, Si-

rupe, Emulsionen, Suspensionen und Lösungen, unter Verwendung inerter, nicht toxischer, pharmazeutisch geeigneter Trägerstoffe oder Lösungsmittel. Hierbei soll die therapeutisch wirksame Verbindung jeweils in einer Konzentration von 0,5 bis 90 Gew.-% der Gesamtmischung vorhanden sein, d.h. in Mengen, die ausreichend sind, um den angegebenen Dosierungsspielraum zu erreichen.

Die Formulierungen werden beispielsweise hergestellt durch Strecken der Wirkstoffe mit Lösungsmitteln und/oder Trägerstoffen, gegebenenfalls unter Verwendung von Emulgiermitteln und/oder Dispergiermitteln, wobei z.B. im Fall der Benutzung von Wasser als Verdünnungsmittel gegebenenfalls organische Lösungsmittel als Hilfs-
lösungsmittel verwendet werden können.

Die Applikation erfolgt in üblicher Weise, vorzugsweise oral, transdermal, intravenös oder parenteral, insbesondere oral oder intravenös. Sie kann aber auch durch Inhalation über Mund oder Nase, beispielsweise mit Hilfe eines Sprays erfolgen, oder topisch über die Haut.

Im Allgemeinen hat es sich als vorteilhaft erwiesen, Mengen von etwas 0,001 bis 10 mg/kg, bei oraler Anwendung vorzugsweise etwa 0,005 bis 3 mg/kg Körpergewicht zur Erzielen wirksamer Ergebnisse zu verabreichen.

Trotzdem kann es gegebenenfalls erforderlich sein, von den genannten Mengen abzuweichen, und zwar in Abhängigkeit vom Körpergewicht bzw. der Art des Applikationsweges, vom individuellen Verhalten gegenüber dem Medikament, der Art von dessen Formulierung und dem Zeitpunkt bzw. Intervall, zu welchen die Verabreichung erfolgt. So kann es in einigen Fällen ausreichend sein, mit weniger als der vorgenannten Mindestmenge auszukommen, während in anderen Fällen die genannte obere Grenze überschritten werden muss. Im Falle der Applikation größerer Mengen kann es empfehlenswert sein, diese in mehreren Einzelgaben über den Tag zu verteilen.

Literatur

1. Forth, Henschler, Rummel; Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; Urban & Fischer Verlag München, 8. Auflage 2001, 429-433
2. Numaguchi H. et al., Probing the interaction between inactivation gating and Dd-sotalol block of HERG, Circ. Res. 11 (2000) 1012-1018.
- 5 3. Nattel, S. et al., Evolution, mechanisms, and classification of antiarrhythmic drugs: focus on class III actions, Am. J. Cardiol. 84 (1999) 11R-19R.
4. Workmann, A. J. et al., A K(ATP) channel opener inhibited myocardial reperfusion action potential shortening and arrhythmias.
- 10 5. Lesage, F. et al., TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure, EMBO J. 15 (1996) 1004-1011.
6. Duprat, F. et al., TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH, EMBO J. 16 (1997) 5464-5471.
7. Stoffel, M. et al., Human G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channel (GIRK1) gene (KCNJ3): localization to chromosome 2 and
15 identification of a simple tandem repeat polymorphism, Genomics 21 (1994) 254-256.
8. Desai, R. et al., Ca²⁺-activated K⁺ channels in human leukemic Jurkat T cells. Molecular cloning, biochemical and functional characterization, J. Biol. Chem. 275 (2000) 39954-39963.
- 20 9. Tamkun M. et al., Molecular cloning and characterization of two voltage-gated K⁺ channel cDNAs from human ventricle, FASEB J. 5 (1991) 331-337.
10. Heid C. et al., Real time quantitative PCR, Genome Res. 6 (1996) 986-9954.
11. EP906572(B1)

Patentansprüche

1. Verwendung von Modulatoren oder eines Modulators der Kaliumkanäle TWIK-1, TASK-1, GIRK1, SK2 oder PCN1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien), koronaren Herzkrankheiten oder Bluthochdruck.
5
2. Eine Methode zum Screenen von Testverbindungen zur Identifizierung von Modulatoren der Kaliumkanäle TWIK-1, TASK-1, GIRK1, SK2 oder PCN1, welche geeignet sind für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien), koronaren Herzkrankheiten oder Bluthochdruck.
10
3. Eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend einen Modulator oder mehrere Modulatoren der Kaliumkanäle TWIK-1, TASK-1, GIRK1, SK2 oder PCN1 zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien), koronaren Herzkrankheiten oder Bluthochdruck.
15
4. Modulator der Kaliumkanäle TWIK-1, TASK-1, GIRK1, SK2 oder PCN1 zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien), koronaren Herzkrankheiten oder Bluthochdruck.
20
5. Verwendung von Modulatoren von Genprodukten, welche im humanen Herz differentiell zwischen linkem Vorhof und linkem Ventrikel exprimiert werden, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien), koronaren Herzkrankheiten, oder Bluthochdruck.
25

Verwendung von Kaliumkanalmodulatoren zur Behandlung von Arrhythmien

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Modulatoren der Kaliumkanäle TWIK-1, TASK-1, GIRK1 SK2 und PCN1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien), koronaren Herzkrankheiten, sowie Bluthochdruck.

Fig. 1

Gen	x-fach stärker im Vorhof MW n =6	Genbank-Acc. No.
sarcolipin	9,6	NM_003063
myosin, light polypeptide 4, alkali; atrial, embryonic	9,2	M36172
A kinase (PRKA) anchor protein 3	8,7	NM_006422
potassium channel, subfamily K, member 1 (TWIK-1)	6,7	U90065
up-regulated by BCG-CWS	5,6	AB040120
myosin, heavy polypeptide 6, cardiac muscle, alpha (cardiomyopathy, hypertrophic 1)	5,3	D00943
titin immunoglobulin domain protein (myotilin)	5,2	NM_006790
signal transducer and activator of transcription 4	4,9	NM_003151
nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1 (COUP-TF 1)	4,2	AI951185
NADP-dependent retinol dehydrogenase/reductase	4,2	NM_005771
natriuretic peptide precursor B	4,2	NM_002521
desmocollin 1	4,1	NM_004948
potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5 (KCNA5)	4,0	NM_002234
secreted frizzled-related protein 1	4,0	NM_003012
phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	3,8	NM_000300
keratin 18	3,7	NM_000224
dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)	3,7	NM_013253
natriuretic peptide precursor A	3,5	M30262
guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 5	3,4	NM_006578

Gen	x-fach stärker im Vorhof MW n = 6	Genbank-Acc. No.
potassium channel, subfamily K, member 3 (TASK-1)	3,3	NM_002246
H factor 1 (complement)	3,1	X04697
up-regulated by BCG-CWS	3,0	NM_022154
phosphodiesterase 8B	3,0	AK023913
cartilage oligomeric matrix protein (pseudoachondroplasia, epiphyseal dysplasia 1, multiple)	2,9	NM_000095
complement component 3	2,7	NM_000064
sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican)	2,7	AF231124
phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)	2,7	AL049593
actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	2,7	NM_001613
chromosome 1 open reading frame 15	2,6	AF288395
corin	2,6	NM_006587
myosin light chain 2a	2,5	NM_021223
transmembrane 6 superfamily member 1	2,4	NM_023003
FK506 binding protein 11, 19 kDa	2,4	NM_016594
visinin-like 1	2,4	NM_003385
angiotensin II receptor, type 1	2,4	NM_004835
H factor (complement)-like 2	2,3	X56210
NY-REN-58 antigen	2,3	NM_016122
similar to neuralin 1	2,2	AL049176
Duffy blood group	2,1	NM_002036
transgelin	2,0	NM_003186
potassium intermediate/small conductance calcium- activated channel, subfamily N, member 2	2,0	NM_021614

Gen	x-fach stärker im Vorhof MW n = 6	Genbank-Acc. No.
endothelin receptor type A	2,0	NM_001957
spermidine/spermine N1-acetyltransferase	2,0	NM_002970
transmembrane 4 superfamily member 2	2,0	NM_004615
B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	2,0	NM_001731
phospholipase A2, group V	1,9	AL158172
fibulin 1	1,9	Z95331
spermidine/spermine N1-acetyltransferase	1,9	M55580
peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	1,9	BF038548
spermidine/spermine N1-acetyltransferase	1,9	BE971383
hephaestin	1,9	NM_014799
Ras-related associated with diabetes	1,9	NM_004165
growth hormone receptor	1,8	NM_000163
peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	1,8	NM_000919
WNT1 inducible signaling pathway protein 2	1,8	NM_003881
melanophilin	1,8	NM_024101
B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	1,8	AL535380
adipose specific 2	1,8	NM_006829
reticulon 4	1,8	AF333336
protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit	1,8	NM_016203
proteolipid protein 2 (colonic epithelium-enriched)	1,8	NM_002668
CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	1,8	BE903880
T-box 5	1,8	NM_000192
actinin, alpha 1	1,7	AI082078
D123 gene product	1,7	NM_006023
Ris	1,7	NM_016563

Gen	x-fach stärker im Vorhof MW n =6	Genbank-Acc. No.
complement component 1, r subcomponent	1,7	AL573058
peroxiredoxin 1	1,7	L19184
S100 calcium binding protein A4 (calcium protein, calvasculin, metastasin, murine placental homolog)	1,6	NM_002961
annexin A4	1,6	NM_001153
phospholipase A2, group V	1,6	NM_000929
tubulin, beta polypeptide	1,6	NM_001069
prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	1,6	NM_000961
Homo sapiens clone 24416 mRNA sequence	1,6	AV712602
complement component 7	1,6	NM_000587
epidermal growth factor receptor pathway substrate 8	1,6	NM_004447
aldo-keto reductase family 1, member C2 (dihydrodiol dehydrogenase 2; bile acid binding protein; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type III)	1,6	M33376
C1q and tumor necrosis factor related protein 1	1,6	NM_030968
reticulon 4	1,5	AB015639
CD47 antigen (Rh-related antigen, integrin- associated signal transducer)	1,5	BG230614
hypothetical protein FLJ10097	1,5	AL523320
peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	1,5	AI022882
glutathione peroxidase 3 (plasma)	1,5	AW149846
catenin (cadherin-associated protein), alpha-like 1	1,5	NM_003798
DKFZP586A0522 protein	1,5	NM_014033
integrin associated protein mRNA	1,5	Z25521
homolog of yeast long chain polyunsaturated fatty	1,5	AL136939

Gen	x-fach stärker im Vorhof MW n =6	Genbank-Acc. No.
acid elongation enzyme 2		
reticulon 4	1,5	AF320999
annexin A1	1,5	NM_000700
HIV-1 TAR RNA binding protein (TARBP-b)	1,5	L22453
DEK oncogene (DNA binding)	1,5	NM_003472
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	1,5	NM_005195
aldo-keto reductase family 1, member A1 (aldehyde reductase)	1,5	NM_006066
KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 2	1,4	NM_006854
tropomyosin 1 (alpha)	1,4	Z24727
hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	1,4	NM_016142
tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory)	1,4	NM_000362
ADP-ribosylation factor-like 5	1,4	NM_012097
nucleosome assembly protein 1-like 1	1,4	NM_004537
peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)	1,4	NM_000942
delta-like 1 homolog (Drosophila)	0,1	U15979
myosin, light polypeptide 3, alkali; ventricular, skeletal, slow	0,1	NM_000258
HSKM-B protein	0,1	AF070592
ankyrin repeat domain 2 (stretch responsive muscle)	0,2	NM_020349
KIAA1733 protein	0,2	AW054711
four and a half LIM domains 2	0,2	NM_001450
carboxypeptidase, vitellogenic-like	0,3	NM_031311

Gen	x-fach stärker im Vorhof MW n =6	Genbank-Acc. No.
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3	0,3	NM_002829
myosin, light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow	0,3	AF020768
gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 4	0,3	NM_000809
dihydropyrimidinase-like 4	0,3	NM_006426
hypothetical protein FLJ20156	0,4	NM_017691
hypothetical protein FLJ14054	0,4	NM_024563
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2	0,4	AF153820
hypothetical protein FLJ32389	0,4	AL551046
ribosomal protein L3-like	0,4	NM_005061
NDRG family member 4	0,4	AV724216
hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 2	0,4	NM_012259
Homo sapiens, clone MGC:8772 IMAGE:3862861, mRNA, complete cds	0,4	BG332462
isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	0,4	U52144
likely ortholog of mouse limb-bud and heart gene	0,5	NM_030915
hypothetical protein FLJ21901	0,5	NM_024622
phospholipase C-like 1	0,5	NM_006226
lipoprotein lipase	0,5	NM_000237
LRP16 protein	0,5	NM_014067
phosphofructokinase, muscle	0,5	U24183
LIM domain binding 3	0,5	AA211481
protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor alpha	0,6	NM_006823
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J,	0,6	BF514158

Gen	x-fach stärker im Vorhof MW n =6	Genbank-Acc. No.
member 8		
H2B histone family, member Q	0,6	NM_003528
NS1-binding protein	0,6	AF205218
acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1 (acetoacetyl Coenzyme A thiolase)	0,6	NM_000019
hyaluronoglucosaminidase 1	0,6	AF173154
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 4	0,6	NM_004981
ras-like protein TC10	0,6	BF348067
crystallin, mu	0,6	NM_001888
ubiquitin specific protease 13 (isopeptidase T-3)	0,6	NM_003940
ras-like protein TC10	0,7	BF348067
actin, alpha 1, skeletal muscle.	0,7	NM_001100
L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain	0,7	AF001903
heat shock 27kDa protein family, member 7 (cardiovascular)	0,7	NM_014424

Fig. 2:

Gen	Genbank Accession Nummer.	Sequenz Primer 1 5'-3'	Sequenz Primer 2 5'-3'	Sequenz Sonde/"Probe" 5'-3'
TWIK-1	NM_002245 SEQ ID NO:1	tgaagaaggacaagg acgagga SEQ ID NO:2	gcctggctctgtgatcga gga SEQ ID NO:3	cagggtgcacatcatag agcatgaccaa SEQ ID NO:4
TASK-1	AF065163 SEQ ID NO:5	acgtctacgcggaggt gct SEQ ID NO:6	tctcgcggctcttgtac c SEQ ID NO:7	cacttcagtcctatgt gctcgtgcct SEQ ID NO:8
GIRK1	NM_002239 SEQ ID NO:9	gttcacgcaacatttg aag SEQ ID NO:10	gggacgacatgagaa gcatt SEQ ID NO:11	cccacccaccttaca gtgtgaaa SEQ ID NO:12
SK2	AF239613 SEQ ID NO:13	tgcacagccctggtgg tag SEQ ID NO:14	tccatcatgaaattgtg cacg SEQ ID NO:15	tggcaaggaagctag aacttaccaaagcag a SEQ ID NO:16
PCN1	NM_002234 SEQ ID NO:17	cagggaacccatttctc tagcat SEQ ID NO:18	tgtcccgtagccac agt SEQ ID NO:19	acgccttctggtgggc agtggtc SEQ ID NO:20
beta-Aktin	NM_001101 SEQ ID NO:21	tccaccttcagcagat gtg SEQ ID NO:22	ctagaagcatttgcggt ggac SEQ ID NO:23	atcagcaagcaggag tatgacgagtccg SEQ ID NO:24

- 9/11 -

Fig. 3

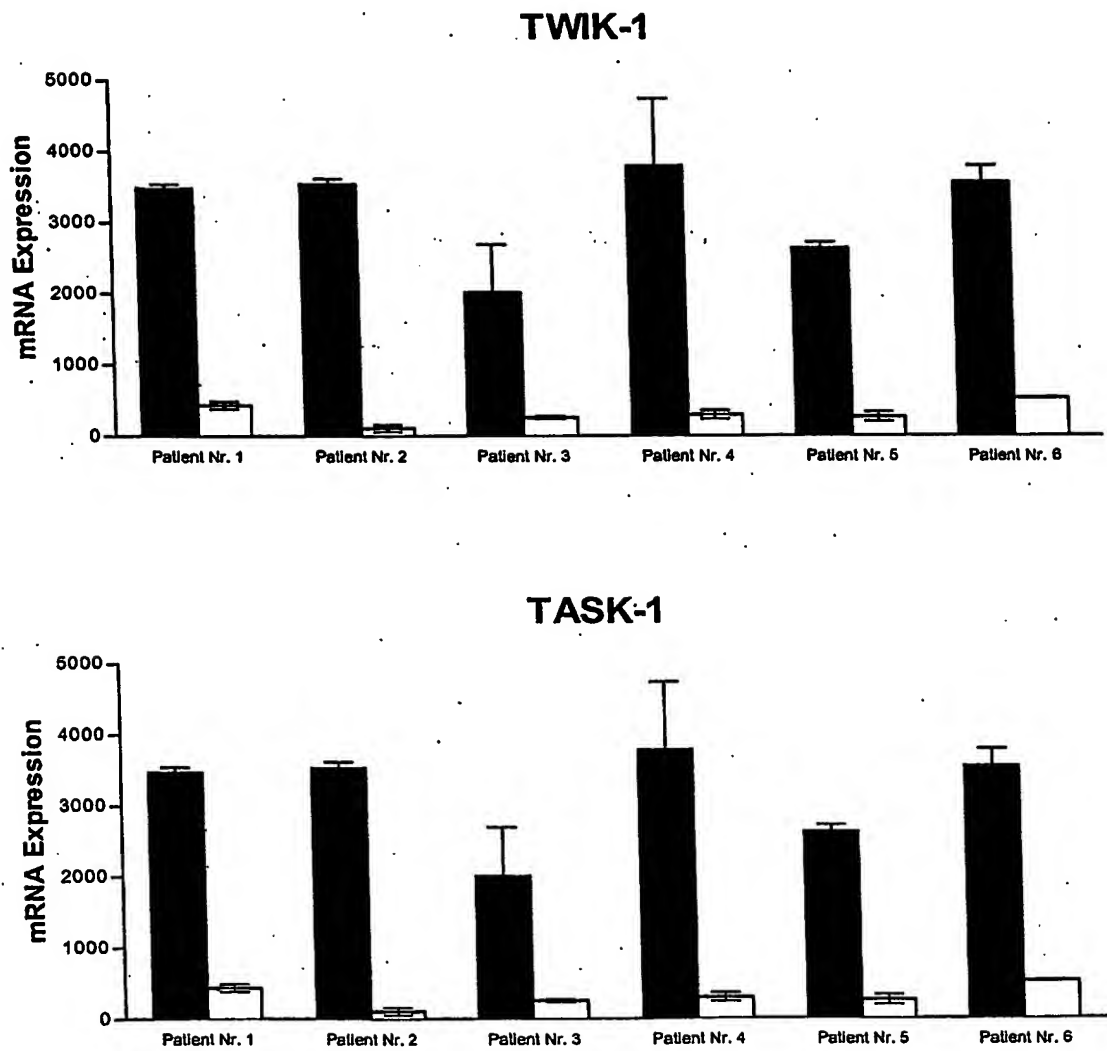
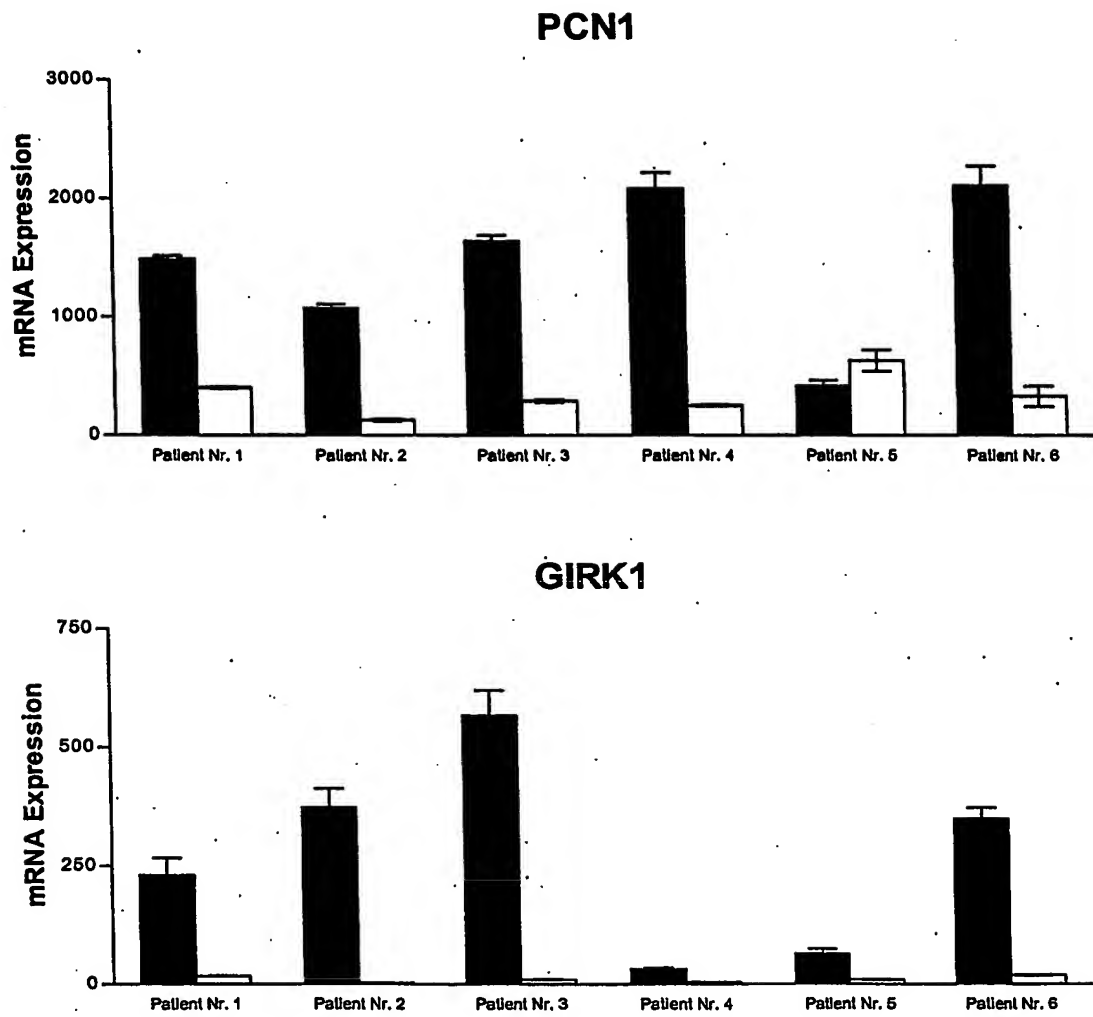
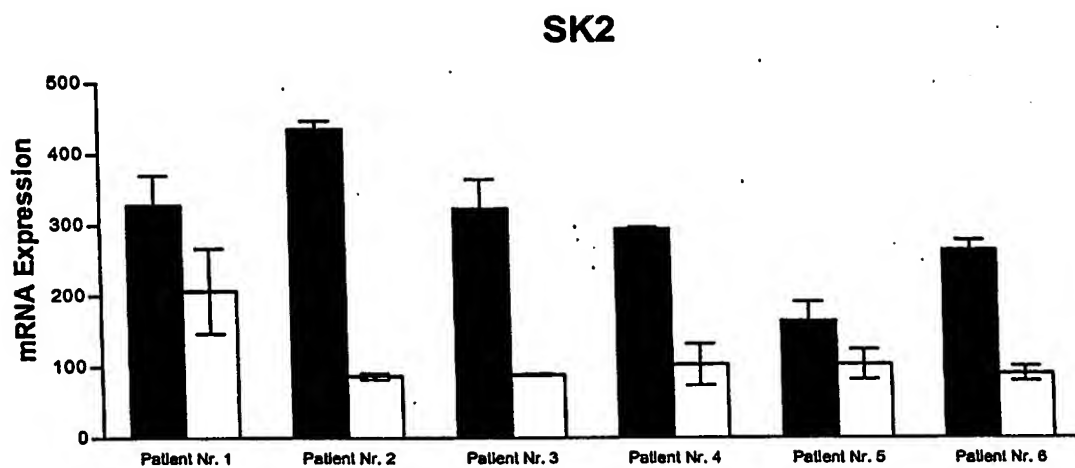


Fig. 3, Fortsetzung



- 11/11 -

Fig. 3, Fortsetzung



SEQUENCE LISTING

<110> Bayer AG, BHC

<120> Vorhof-selektiv exprimierte Kaliumkanäle

<130> Le A 36 823

<160> 24

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1901

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gggcaggaag acggcgctgc ccggaggagc ggggcgggcg ggcgcgcggg ggagcgggcg      60
gcgggcggga gccaggcccc ggcgggggcg ggggcggcgg ggccagaaga ggcggcgggc      120
cgcgctccgg ccggtctgcg gcgttggcct tggttttggc tttggcggcg gcggtggaga      180
agatgctgca gtccctggcc ggcagctcgt gcgtgcgcct ggtggagcgg caccgctcgg      240
cctggtgctt cggcttcctg gtgctgggct acttgctcta cctggtcttc ggcgcagtgg      300
tcttctcctc ggtggagctg ccctatgagg acctgctgcg ccaggagctg cgcaagctga      360
agcgacgctt cttggaggag cacgagtgcc tgtctgagca gcagctggag cagttcctgg      420
gccgggtgct ggaggccagc aactacggcg tgtcggtgct cagcaacgcc tcgggcaact      480
ggaactggga cttcacctcc gcgctcttct tcgccagcac cgtgctctcc accacaggtt      540
atggccacac cgtgcccttg tcagatggag gtaaggcctt ctgcatcatc tactccgtca      600
ttggcattcc cttcacctc ctgttcctga cggctgtggt ccagcgcac accgtgcacg      660
tcaccgcag gcggctcctc tacttcaca tccgctgggg cttctccaag caggtggtgg      720
ccatcgcca tgccgtgctc cttgggtttg tcaactgtgc ctgcttcttc ttcacccgg      780
ccgctgtctt ctcagtcctg gaggatgact ggaacttcct ggaatccttt tatttttgtt      840
ttatttcctt gagcaccatt ggccctgggg attatgtgcc tggggaaggc tacaatcaaa      900
aattcagaga gctctataag attgggatca cgtgttacct gctacttggc cttattgcc      960
tgttggtagt tctggaaacc ttctgtgaac tccatgagct gaaaaaatc agaaaaatgt     1020
tctatgtgaa gaaggacaag gacgaggatc aggtgcacat catagagcat gaccaactgt     1080

```

ccttctctc gatcacagac caggcagctg gcatgaaaga ggaccagaag caaatgagc 1140
 cttttgtggc caccagtc tctgcctgcg tggatggccc tgcaaaccat tgagcgtagg 1200
 atttgttgca ttatgctaga gcaccagggc cagggtgcaa ggaagaggct taagtatgtt 1260
 cttttttatc agaatgcaaa agcgaaaatt atgtcacttt aagaaatagc tactgtttgc 1320
 aatgtcttat taaaaaaca caaaaaaaga cacatggaac aaagaagctg tgaccccagc 1380
 aggatgtcta atatgtgagg aaatgagatg tccacctaaa attcatatgt gacaaaatta 1440
 tctcgacctt acataggagg agaatacttg aagcagtatg ctgctgtggt tagaagcaga 1500
 ttttatactt ttaactggaa actttggggg ttgcatttag atcatttagc tgatggctaa 1560
 atagcaaaat ttatatctag aagcaaaaaa aaaaagcata gagatgtgtt ttataaatag 1620
 gtttatgtgt actggtttgc atgtaccac ccaaatgat ttttttggga gaatctaagt 1680
 caaactcact atttataatg cataggtaac cattaactat gtacatataa agtataaata 1740
 tgtttatatt ctgtacatat gggttaggtc accagatcct agttagttc tgaaactaag 1800
 actatagata ttttgtttct tttgatttct ctttatacta aagaatccag agttgctaca 1860
 ataaaataag gggaataata aacttgagag tgaataacca t 1901

<210> 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer 1

<400> 2

tgaagaagga caaggacgag ga

22

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer 2

<400> 3

gcctgggtctg tgatcgagga

20

<210> 4
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> probe

<400> 4

caggtgcaca tcatagagca tgaccaa

27

<210> 5
 <211> 2590
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5

tgccctgcgc ggagagcggc gagcgcagcc atgccccagg ccgcctccgg ggcagcagca	60
gcggcggccg gggccgatgc gcggggccggg ggcgcggggg ggccggcggc ggcggggcg	120
ggacgatgaa ggggcagaac gtgcgcacgc tggcgctcat cgtgtgcacc ttcacctacc	180
tgctggtggg cgccgcggtc ttcgacgcgc tggagtcgga gcccgagctg atcgagcggc	240
agcggctgga gctgcggcag caggagctgc gggcgcgcta caacctcagc caggggcggt	300
acgaggagct ggagcgcgtc gtgctgcgcc tcaagccgca caaggccggc gtgcagtggc	360
gcttcgccgg ctccttctac ttgccatca ccgtcatcac caccatcggc tacgggcacg	420
cggcaccag caccgatggc ggcaaggtgt tctgcatgtt ctacgcgctg ctgggcatcc	480
cgctcacgct cgcatgttc cagagcctgg gcgagcgcac caacaccttg gtgaggtacc	540
tgtgcaccg cgccaagaag gggctgggca tgcggcgcgc cgacgtgtcc atggccaaca	600
tgggtgctcat cggtttcttc tcgtgcatca gcacgctgtg catcggcgcc gccgccttct	660
cccactacga gcactggacc ttcttccagg cctactacta ctgcttcac accctcacca	720
ccatcggtt cggcgactac gtggcgctgc agaaggacca ggcctgcag acgcagccgc	780
agtaagtggc cttcagcttc gtctacatcc ttacgggcct caccgtcatc ggcgccttcc	840
tcaacctcgt ggtgctgcgc ttcatgacca tgaacgccga ggacgagaag cgcgacgccg	900
agcaccgcgc gctgctcag cgcaacgggc aggcgggcgg cggcgagggg ggtggcagcg	960
cgcacactac ggacaccgcc tcatccacgg cggcagcggg cggcgggcgg ttccgcaacg	1020
tctacgcgga ggtgctgcac ttccagtcca tgtgctcgt cctgtggtac aagagccgcg	1080

```

agaagctgca gtactccatc cccatgatca tcccgcggga cctctccacg tccgacacgt 1140
gcgtggagca gagccactcg tcgccgggag ggggcggccg ctacagcgac acgccctcgc 1200
gacgctgcct gtgcagcggg gcgccacgct ccgccatcag ctcggtgtcc acgggtctgc 1260
acagcctgtc caccttccgc ggccatcatga agcgcaggag ctccgtgtga ctgccccgag 1320
ggacctggag cacctggggg cgcggggcgg ggacccctgc tgggaggcca ggagactgcc 1380
cctgctgcct tctgccagt gggacccgc acaacatccc tcaccactct cccccagcac 1440
ccccatctcc gactgtgcct gcttgacca gccggcagga ggccgggctc tgaggacccc 1500
tggggcccc atcggagccc tgcaaattcc gagaaatgtg aaacttggtg gggtcaggga 1560
ggaaaggcag aagctgggag cctcccttcc ctttgaaaat ctaagaagct cccagtcctc 1620
agagaccctg ctggtaccac accccacctt cggaggggac ttcattgttc gtgtacgttt 1680
gcatctctat ttatacctct gtctgtctag gtctcccacc ttccttgggt tccaaaagcc 1740
aggggtgtcta tgtccaagtc acccctactc agccccactc ccttctctca tccccagctg 1800
tgtctcccaa cctcccttcg tgttgtttg catggctttg cagttatgga gaaagtggaa 1860
accagcagct ccctaaagct ggccccaga aagcaggaca gaaagaagga gggacaggca 1920
ggcagcagga ggggcgagct gggaggcagg aggcagcggc ctgtcagctc gcagaatgg 1980
cgcactggag gttcaagcta actggcctcc agccacattc tcatagcagg taggacttca 2040
gccttcagga cactgccctt agaattctgga acagaagact tcagactcac cataattgct 2100
gataattacc cactcttaaa tttgtcgagt gatTTTTtagc ctctgaaaac tctatgctgg 2160
ccactgattc ctttgagtct cacaaaacc tacttaggtc atcagggcag gatttctcac 2220
tcccatttta cagatgagaa tactgaggcc tggacagggt aagtgaccag agagcaaaag 2280
gcaaaggggt gggggctggg tgcagtggct cacacctgta ttccaacac tttggaggc 2340
tgaggttgga ggattgcttg agcccaggaa ttcgagacca gcctagggtga catagtgaga 2400
ccccatctct acaaaaaata aaaaattaac caggtgtggt ggcacgtgcc tgggagtccc 2460
agcgacttgg gaggtgagg tgggaggatt gtttgagcct gggaggtcga ggctgtagtg 2520
agccctgatt gcaccactgt actccagcct gggtgacagg gcaagaccct gtctcaaaaa 2580
aaaaaaaaa 2590

```

```

<210> 6
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

```

<220>
<223> primer 1

<400> 6

acgtctacgc ggaggtgct

19

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer 2

<400> 7

tctcgcggct cttgtacc

18

<210> 8
<211> 26
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe

<400> 8

cacttccagt ccatgtgctc gtgect

26

<210> 9
<211> 2890
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9

ctcctgccca ggggagaagg agaggcgtct gcagggggca gagaccgcag ctacctgccg 60
ggtgcgcccc ccaccagga gcgctegctt cgcccccttt cctccccgc cccacctcc 120
ttattggtgc tagtttgag cgccagctc ctgcgccttc gcttcgcgtt tgaatctggc 180
tcgccccctc gtattatgtc tgcactccga aggaaatttg gggacgatta tcaggtagtg 240
accacatcgt ccagcggctc gggcttgag cccaggggc caggccagga ccctcagcag 300

cagcttgtgc ccaagaagaa gcggcagcgg ttcgtggaca agaacggccg gtgcaatgta	360
cagcacggca acctgggcag cgagacaagc cgctacctct cggacctctt caccacgctg	420
gtggacctca agtggcgctg gaacctcttc atcttcattc tcacctacac cgtggcctgg	480
cttttcatgg cgtccatgtg gtgggtgatc gcctacactc ggggcgacct gaacaaagcc	540
cacgtcggta actacacgcc ttgcgtggcc aatgtctata acttcccttc tgccttctc	600
ttcttcatcg agacggaggg caccatcggc tatggctacc gatacatcac agacaagtgc	660
cccaggggca tcacctctt cctcttcag tccatcctgg gctccatcgt ggacgccttc	720
ctcatcggtc gcatgttcat caagatgtcc cagcccaaga agcgcgccga gacctcatg	780
ttcagcgagc acgcggtgat ctccatgagg gacggaaaac tcacgcttat gttccgggtg	840
ggcaacctgc gcaacagcca catggtctcc ggcgagattc gctgcaagct gctcaaattc	900
cggcagacac ctgaggggtga gttccttccc cttgaccaac ttgaactgga tgtagggttt	960
agtacagggg cagatcaact ttttcttgtg tccccctca caatttgcca cgtgatcgat	1020
gcaaaaagcc ccttttatga cctatcccag cgaagcatgc aaactgaaca gttcgagatt	1080
gtcgtcatcc tagaaggcat tgtggaaaca actgggatga cttgtcaagc tcgaacatca	1140
tatactgaag atgaagttct ttggggtcat cgttttttct ctgtaatttc cttagaagag	1200
ggattcttta aagttgatta ctcccagttc catgcaacat ttgaagtccc caccacacct	1260
tacagtgtga aagagcagga ggaaatgctt ctcatgtcgt cccctttaat agcaccagcc	1320
ataactaaca gcaaagaaag acataattct gtggaatgct tagatggact agatgatatt	1380
actacaaaac taccatctaa gctgcagaaa attactggaa gagaagactt tcccaaaaa	1440
ctcttgagga tgagttctac aacttcagaa aaagcctaca gcttggggaga cttgccccatg	1500
aaacttcaac gaataagttc agttccgggc aactcagaag aaaaactggg atctaaaacc	1560
accaagatgt tatctgatcc catgagccag tctgtggctg atttgccacc aaagcttcaa	1620
aagatggctg gaggagcagc taggatggaa gggaaccttc cagccaaatt aagaaaaatg	1680
aactctgatc gcttcacata acaaagcact cccttaggca ttatttaatg tttgatttag	1740
taatagtcca atatttggcg atgaggtaat tctccctaag gaatctgaaa gtatattttc	1800
ctcccagttc tacaagcata tttgagaacc cttcctttcc caagtattgc gaatgtgcag	1860
aaagcaacag ttacggaggg aggacatcat aaggaagtta ttaacgggca tgtattatca	1920
catcaagcat gcaataatgt gcaaattttg catttagttt tatggcatga tttatatatg	1980
gcatatttat attgtatatt ctggaaaaaa aatatatata tatatttaaa ggggagatac	2040
tctccctgac atttctaaca tatgtattaa gccaaacatg agtgaatagc tttcagggcg	2100
ataaaactaa atatatgtct gtgtgtgtgt gtgtatgtat acacacatat acatatatat	2160

```

atacacatac atacacatac atacatacat acatatatat ctgataaaat tgtgatgttt 2220
tggtcaaagt tgtagttctt gtgcatgttt actttattag agtaggaagg ctactggcat 2280
taattattaa taccaaatat tttagcctta aatttttgtc attttaaaat ctgatttaat 2340
gttttctgct gtttaaggtc ttgggaggct ttcaattgta ttttatatga gagaatcaca 2400
caagtttgtg ctatctatgg ccctgcaaaa atataaccat tacatgttta aattgtaaat 2460
tttagagcat accagtactc agtatagcat tgaacatttc ttatgatttt taaaagttgc 2520
tagtactggg gagaataaat tggtgattaa ttgagaatt attcctttcc tagactaatt 2580
aaaatctgga aatctgtttt gtatatgata taatacaaag atgagctctg aacaaacact 2640
gaatcatgtt aatagacagt agccaagtta tattgaatat atcagaatct gtgtgaagtt 2700
acacaattaa ttgtccctgt ttcaaaactga gttaaattgga aacattttct ttctttttct 2760
ggaaattttg tccattttta aaaccaatca ttttaagaag acatgacaat gcaatgaaac 2820
agatgataaa tatttatgct taaaatatgt atgtctaatt gagtctcttt tttattctgt 2880
tttcttgttt 2890

```

```

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

```

```

<220>
<223> primer 1

```

```

<400> 10

```

```

gttccacgca acatttgaag

```

20

```

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

```

```

<220>
<223> primer 2

```

```

<400> 11

```

```

gggacgacat gagaagcatt

```

20

<210> 12
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> probe

<400> 12

cccacccac cttacagtgt gaaa

24

<210> 13
 <211> 2510
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 13

cggcggcagc agcccatgcc tccggtgcaa cagctgcgcc tctccgggtg ccccggcggc	60
gggggcggga gataacctgt ccctgctgct cgcacctcc tcgcccggcg gcgccttccg	120
gaccgcacc tctcgccgc tgcggggtc gtctgctgc tgcgtgctgct gctcgctcg	180
ccggggcagc cagctcaatg tgagcgagct gacgcgtcc agccatgcca gtgcgtccg	240
gcagcagtac gcgcagcagt ccgcgcagca gtcggcgctcc gcctcccagt accaccagt	300
ccacagcctg cagcccgcg ccagcccccac gggcagcctc ggaggtctgg gctccgcgc	360
cccgtctctg caccaccacc accaccgcga cccggcgcac caccagcacc accagcccca	420
ggcgcgccgc gagagcaacc ccttcaccga aatagccatg agcagctgca ggtacaacgg	480
gggcgtcatg cggccgctca gcaacttgag cgcgtcccgc cggaacctcc acgagatgga	540
ctcagaggcg cagcccctgc agccccccgc gtctgtcgga ggaggtggcg gcgcgtcctc	600
cccgtctgca gacgtgccc ccgcgcgcgc tgtttcgctc tcagcccccg agatcgtggt	660
gtctaagccc gagcacaaca actccaaca cctggcgctc tatggaaccg gcggcggagg	720
cagcactgga ggaggcggcg gcggtggagg gagcgggcac ggcagcagca gtggcaccaa	780
gtccagcaaa aagaaaaacc agaacatcgg ctacaagctg ggccaccggc gcgcctgtt	840
cgaaaagcgc aagcggctca gcgactacgc gtcctcttc ggcattgtcg gcctcgtggt	900
catggctcatc gagaccgagc tgcgtgggg cgctacgac aaggcgtcgc tgtattcctt	960
agctctgaaa tgccttatca gtctctccac gatcatcctg ctgggtctga tcatcgtgta	1020
ccacgccagg gaaatacagt tgttcatggt ggacaatgga gcagatgact ggagaatagc	1080
catgacttat gagegtatct tcttcctctg cttggaaata ctgggtgtgt ctattcatcc	1140

catacctggg aattatacat tcacatggac ggccccggctt gccttctcct atgccccatc 1200
 cacaaccacc gctgatgtgg atattatattt atctatacca atgttcttaa gactctatct 1260
 gattgccaga gtcatgcttt tacatagcaa acttttccact gatgcctcct ctagaagcat 1320
 tggagcactt aataagataa acttcaatac acgttttggt atgaagactt taatgactat 1380
 atgcccagga actgtactct tggtttttag tatctcatta tggataattg ccgcatggac 1440
 tgtccgagct tgtgaaaggt accatgatca acaggatggt actagcaact tccttggagc 1500
 gatgtggttg atatcaataa cttttctctc cattgggttat ggtgacatgg tacctaacac 1560
 atactgtgga aaaggagtct gcttacttac tggaattatg ggtgctggtt gcacagccct 1620
 ggtggtagct gtagtggcaa ggaagctaga acttaccaaa gcagaaaaac acgtgcacaa 1680
 tttcatgatg gatactcagc tgactaaaag agtaaaaaat gcagctgcca atgtactcag 1740
 ggaaacatgg ctaatttaca aaaatacaaa gctagtgaag aagatagatc atgcaaaagt 1800
 aagaaaacat caacgaaaat tcctgcaagc tattcatcaa ttaagaagtg taaaaatgga 1860
 gcagaggaaa ctgaatgacc aagcaaacac tttggtggac ttggcaaaga ccagaaacat 1920
 catgtatgat atgatttctg acttaaacga aaggagtgaag gacttcgaga agaggattgt 1980
 taccctggaa acaaaactag agactttgat tggtagcatc cacgccctcc ctgggctcat 2040
 aagccagacc atcaggcagc agcagagaga tttcattgag gctcagatgg agagctacga 2100
 caagcacgtc acttacaatg ctgagcggtc ccggtcctcg tccaggaggc ggcggtcctc 2160
 ttccacagca ccaccaactt catcagagag tagctagaag agaataagtt aaccacaaaa 2220
 taagactttt tgccatcata tggccaatat tttagctttt attgtaaagc ccctatgggt 2280
 ctaatcagcg ttatccgggt tctgatgtca gaatcctggg aacctgaaca ctaagtttta 2340
 ggccaaaatg agtgaaaact cttttttttt ctttcagatg cacagggaat gcacctatta 2400
 ttgctatata gattgttcct cctgtaattt cactaacttt ttattcatgc acttcaaaca 2460
 aactttacta ctacattata tgatatataa taaaaaaagt taatttcgga 2510

<210> 14
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer 1

<400> 14

tgcacagccc tggtag

19

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer 2

<400> 15

tccatcatga aattgtcac g

21

<210> 16
<211> 31
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe

<400> 16

tggcaaggaa gctagaactt accaaagcag a

31

<210> 17
<211> 2865
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 17

ttttcggctg cttggtaacg ggctgccaga agagagagag gcagagagca gggcagcggc	60
ttcttgacgt cagggccaag cgaggggatc gcgccagcaa cccagctct cccagagag	120
gggcgggccc accgctggag cggagcctga cgccaggcgc ccgaggagcg tgagtagggg	180
gcgcgggagc cggctcagctg gggcgagca tgccctctgc tcccgcgcca tggagatcgc	240
cctgggtgcc ctggagaacg gcggtgccat gaccgtcaga ggaggcgatg agggccgggc	300
aggctgcggc caggccacag ggggagagct ccagtgtccc ccgacggctg ggctcagcga	360
tgggccaag gagccggcgc caaaggggag cggcgcgcag agagacgcgg actcgggagt	420
gcggcccttg cctccgctgc cggacccggg agtgcggccc ttgcctccgc tgccagagga	480

gctgccacgg cctcgacggc cgcctcccgga ggacgaggag gaagaaggcg atccccggcct 540
 gggcacgggtg gaggaccagg ctctggggcac ggcgtccctg caccaccagc gcgtccacat 600
 caacatctcc gggctgcgt ttgagacgca gctgggcacc ctggcgcagt tccccaacac 660
 actcctgggg gaccccgcca agcgcctgcg ctacttcgac cccctgagga acgagtactt 720
 cttcgaccgc aaccggccca gcttcgacgg tatcctctac tactaccagt ccggggggccg 780
 cctgcggagg ccggtcaacg tctccctgga cgtgttcgcg gacgagatac gcttctacca 840
 gctggggggac gaggccatgg agcgtctccg cgaggatgag ggcttcatta aagaagagga 900
 gaagcccctg ccccgcaacg agttccagcg ccagggtgtgg cttatcttcg agtatccgga 960
 gagctctggg tccgcgcggg ccacgcgat cgtctcggtc ttggttatcc tcatctccat 1020
 catcaccttc tgcttgagga ccctgcctga gttcaggat gaacgtgagc tgctccgcca 1080
 ccctccggcg cccaccagc ctcccgcgcc cgccctggg gccaacggca gcgggggtcat 1140
 ggccccgccc tctggcccta cgggtgcacc gctcctgccc aggaccctgg ccgaccctt 1200
 cttcatcgtg gagaccacgt gcgtcatctg gttcaccttc gagctgctcg tgcgttctt 1260
 cgcctgcccc agcaaggcag ggttctcccg gaacatcatg aacatcatcg atgtggtggc 1320
 catcttcccc tacttcatca ccctgggcac cgaactggca gagcagcagc caggggggtg 1380
 aggaggcggc cagaatgggc agcaggccat gtccctggcc atcctccgag tcatccgcct 1440
 ggtccgggtg ttccgcatct tcaagctctc ccgccactcc aaggggctgc agatcctggg 1500
 caagaccttg caggcctcca tgaggagct ggggctgctc atcttcttcc tcttcatcgg 1560
 ggtcatcctc ttctccagtg ccgtctactt cgcagaggct gacaaccagg gaaccattt 1620
 ctctagcatc cctgacgct tctggtgggc agtggtcacc atgaccactg tgggctacgg 1680
 ggacatgagg cccatcactg ttgggggcaa gatcgtgggc tcgctgtgtg ccatcgccgg 1740
 ggtcctcacc attgccctgc ctgtgcccgt catcgtctcc aacttcaact acttctacca 1800
 ccgggaaacg gatcacgagg agccggcagt ccttaaggaa gagcagggca ctcagagcca 1860
 ggggcccggg ctggacagag gagtccagcg gaaggtcagc gggagcaggg gatccttctg 1920
 caaggctggg gggaccctgg agaatgcaga cagtgcccgga aggggcagct gccccctaga 1980
 gaagtgtaac gtcaaggcca agagcaacgt ggacttgagg aggtcccttt atgccctctg 2040
 cctggacacc agccgggaaa cagatttgtg aaaggagatt caggcagact ggtggcagtg 2100
 gagtagggaa tgggaggctt gctgaacatg gatattctaca ttataccgca gagtatttga 2160
 agtcacactg taacctcagt ctaccctct cctttcactc ctttccctccc tccctcgatc 2220
 ccccatcttt ctctattctt tccatgacac ccaagggtcg cctattttta aaaagtacca 2280
 cattccatga cgcaggagct gtggaaatgg tgagcgtgt gagatggatg tatttgtagc 2340

cagtctccta taccagcag agggataacc caaacaaaa tgactctaaa tagcccagat 2400
 cccaagagat tatgtaactc ctccatccat gtgttccaaa tttgctttac atatgattgt 2460
 atttgtgtat aggggaaaaat attattttta tgcctggtaa gtggcttttt gtactgtagt 2520
 tcagatagag atattttggg tatattttca agatacatgt tgtatttatg gaagaaagag 2580
 ttgtcctgat gtttttctgt gttacttata ttagagtcag agatcttggg atgggctgtt 2640
 ctgtttcctg tgtctccaag cctctgtctt ttctgggatg tggatttggg gctttgtgtc 2700
 tagggcagag tatgttcttg aagaaaggca aatctgactt tttctgtgcg ccttaaacaa 2760
 ttcttgaac tttcttcaaa aagcatttta atgatattgg aggaatactt ctgataattt 2820
 attgtcttta ttttatccc aggaataaaa aggttacctt gttga 2865

<210> 18
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer 1

<400> 18

caggaaccc atttctctag cat

<210> 19
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer 2

<400> 19

tgtccccgta gccacagt

19

<210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> probe

<400> 20

acgccttctg gtgggcagtg gtc

23

<210> 21
 <211> 1793
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 21

cgcggtccgcc ccgcgagcac agagcctcgc ctttgccgat ccgcccggccg tccacaccg	60
ccgccagctc accatggatg atgatatcgc cgcgctcgtc gtcgacaacg gctccggcat	120
gtgcaaggcc ggcttcgcgg gcgacgatgc cccccgggcc gtcttccct ccatcgtggg	180
gcgccccagg caccagggcg tgatggtggg catgggtcag aaggattcct atgtgggcga	240
cgaggcccag agcaagagag gcatacctcac cctgaagtac cccatcgagc acggcatcgt	300
caccaactgg gacgacatgg agaaaatctg gcaccacacc ttctacaatg agctgcgtgt	360
ggctcccag gagcaccgcc tgctgctgac cgaggcccc ctgaacccca aggccaaccg	420
cgagaagatg acccagatca tgtttgagac cttcaacacc ccagccatgt acgttgctat	480
ccaggctgtg ctatccctgt acgcctctgg ccgtaccact ggcacgtga. tggactccgg	540

tgacgggggtc acccacactg tgcccatcta cgaggggtat gccctcccc atgccatcct	600
gcgtctggac ctggctggcc gggacctgac tgactacctc atgaagatcc tcaccgagcg	660
cggctacagc ttcaccacca cggccgagcg ggaaatcgtg cgtgacatta aggagaagct	720
gtgctacgtc gccctggact tcgagcaaga gatggccacg gctgcttcca gctcctccct	780
ggagaagagc tacgagctgc ctgacggcca ggtcatcacc attggcaatg agcggttccg	840
ctgccctgag gcactcttcc agccttcctt cctgggcatg gagtcctgtg gcatccacga	900
aactaccttc aactccatca tgaagtgtga cgtggacatc cgcaaagacc tgtacgccaa	960
cacagtgtg tctggcggca ccaccatgta ccctggcatt gccgacagga tgcagaagga	1020
gatcactgcc ctggcaccca gcacaatgaa gatcaagatc attgctcctc ctgagcgcaa	1080
gtactccgtg tggatcggcg gctccatcct ggctcgtg tccaccttcc agcagatgtg	1140
gatcagcaag caggagtatg acgagtcctg cccctccatc gtccaccgca aatgcttcta	1200
ggcggactat gacttagttg cgttacaccc tttcttgaca aaacctaaact tgcgcagaaa	1260
acaagatgag attggcatgg ctttatttgt tttttttgtt ttgttttggg tttttttttt	1320
tttttggtt gactcaggat ttaaaaactg gaacgggtgaa ggtgacagca gtcggttgga	1380
gcgagcatcc cccaaagttc acaatgtggc cgaggacttt gattgcacat tgttgttttt	1440
ttaatagtca ttocaaatat gagatgcatt gttacaggaa gtcccttgcc atcctaaaag	1500
ccacccact tctctctaag gagaatggcc cagtctctc ccaagtccac acaggggagg	1560
tgatagcatt gctttcgtgt aaattatgta atgcaaaatt tttttaatct tcgccttaat	1620
acttttttat tttgttttat tttgaatgat gagccttcgt gcccccctt cccccttttt	1680
gtccccaac ttgagatgta tgaaggcttt tggctctcct gggagtgggt ggaggcagcc	1740
agggttacc tgtacactga cttgagacca gttgaataaa agtgcacacc tta	1793

<210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer 1

<400> 22

tccaccttcc agcagatgtg

20

- 15 -

<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer 2

<400> 23

ctagaagcat ttgcggtgga c

21

<210> 24
<211> 28
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe

<400> 24

atcagcaagc aggagtatga cgagtccg

28

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.